

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 novembre 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/092652 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C08F 265/08, 265/10,
B01D 67/00, 71/42, 57/02, C08F 293/00

(74) Mandataire : **CABINET GERMAIN & MAUREAU**;
12, rue Boileau, F-69006 Lyon (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/01570

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 7 mai 2002 (07.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/06324 14 mai 2001 (14.05.2001) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **BIO
MERIEUX** [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy
L'étoile (FR).

(72) Inventeurs; et

Publiée :

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **DELAIR,
Thierry** [FR/FR]; Le Coin, F-69700 Echalas (FR). **ZHOU,
Guangchang** [CN/US]; Department of Chemistry - Clark
Atlanta University, 223 James P. Brawley Drive S.W.,
Atlanta, GA 30314 (US). **ELAISSARI, Abdelhamid**
[FR/FR]; 7, rue Jacques Monod, F-69007 Lyon (FR).

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE) LATEX COMPRISING NITRILE FUNCTIONS ON THE SURFACE
THEREOF

(54) Titre : LATEX DE POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE) COMPORTANT EN SURFACE DES FONCTIONS NITRILE

(57) Abstract: The invention relates to a method of preparing hydrophilic and heat-sensitive polymer particles carrying polar func-
tional groups by means of radical co-polymerisation. The inventive method is characterised in that it involves the homopolymerisation
of a water-soluble monomer functionalised by said polar groups in order to obtain a hydrophobic homopolymer functionalised by
said groups and the subsequent co-polymerisation with the non-functionalised hydrophilic and heat-sensitive polymer. The invention
also relates to the particles thus obtained.

(57) Abrégé : Procédé de préparation de particules de polymère thermosensible et hydrophile portant des groupes fonctionnels
polaires par copolymérisation radicalaire, caractérisé en ce que l'on homopolymérise un monomère hydrosoluble fonctionnalisé par
lesdits groupes polaires pour obtenir un homopolymère hydrophobe fonctionnalisé par lesdits groupes puis on copolymérise avec le
polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé, et particules ainsi obtenues.



WO 02/092652 A1

LATEX DE POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE) COMPORTANT EN SURFACE DES FONCTIONS NITRILE

La présente invention a pour objet des latex hydrophiles,
5 thermosensibles à base de poly(N-isopropylacrylamide), fonctionnalisés permettant la réalisation de supports particuliers.

Ces latex fonctionnalisés ont de nombreuses applications en raison de la thermosensibilité du poly(N-isopropylacrylamide), notamment dans le domaine du diagnostic, pour la séparation par immobilisation chimique ou
10 adsorption de molécules biologiques puis dosage.

Les molécules biologiques peuvent être immobilisées par liaison covalente ou adsorption physique à la surface des particules. Des particules de poly(N-isopropylacrylamide) comprenant un cœur, et une surface portant des groupes fonctionnels, comme les fonctions acide carboxylique ou amine ont
15 été développées comme supports solides pour l'immobilisation de molécules biologiques.

Des particules, comportant une charge magnétique, comprenant un noyau à base d'un polymère, une couche interne à base d'un second polymère thermosensible dans laquelle est distribué un matériau magnétique,
20 et une couche externe, dite couche d'encapsulation éventuellement fonctionnalisée à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, sont décrits par exemple dans FR-A-2749082. Le polymère de la couche d'encapsulation susceptible d'interagir avec une molécule biologique étant de préférence un polymère hydrophile
25 éventuellement fonctionnalisé par un ou plusieurs groupes choisis parmi les fonctions carboxylique, aldéhydrique, thiol et amine.

Ces particules sont utilisées comme support solide pour l'immobilisation de molécules biologiques comme les enzymes et les protéines, notamment sous forme de latex.

30 Différents modes de polymérisation peuvent être utilisés pour préparer ces supports, par polymérisation on entend aussi bien copolymérisation que homopolymérisation.

On connaît par exemple la polymérisation en réacteur fermé dite polymérisation en « batch » dans laquelle les monomères sont introduits dans le réacteur avant le début de la réaction de polymérisation avec les autres ingrédients et sans ajout ultérieur. Cette méthode est efficace pour la
5 copolymérisation d'un mélange de monomères hydrophobes et hydrophiles car le monomère hydrophobe forme principalement le cœur et le monomère hydrophile forme l'écorce si la polymérisation a lieu dans la phase aqueuse.

On connaît la polymérisation en « shot », cette technique est utilisable lorsque l'on connaît la cinétique de la polymérisation en réacteur
10 fermé. Lorsque la polymérisation en réacteur fermé est en cours, une quantité supplémentaire de monomère fonctionnel seul ou en présence de mélange de monomères est introduite dans le réacteur de façon contrôlée, permettant de favoriser l'incorporation du monomère fonctionnel à la surface des particules. La sélection des conditions expérimentales (degré de conversion au moment
15 de l'addition, composition et concentration du mélange des monomères) permet d'optimiser les rendements de surface.

On connaît également la polymérisation sur semence « seed polymerization » qui consiste à introduire le monomère fonctionnel ou un mélange de monomères dans un réacteur contenant un latex déjà constitué et
20 caractérisé, le monomère fonctionnel ou le mélange de monomères pouvant être additionné sur la semence en une seule étape ou en semi-continu.

Cependant pour que les dosages soient précis il est nécessaire que les biomolécules immobilisées puissent conserver leur activité biologique spécifique, et cette activité biologique, dépendante de facteurs stériques et
25 d'orientation peut être éventuellement diminuée, voire supprimée, par les techniques d'immobilisation.

Un essai d'amélioration de la technique d'immobilisation a été effectué en créant une technique mettant en œuvre des interactions régiosélectives, comme par exemple les interactions dipolaires.

30 Ces interactions dipolaires mettant en œuvre des régions précises des biomolécules portant des groupes polaires, la prédictibilité de la conservation de l'activité biologique peut être bonne.

Les polymères portant des fonctions nitrile se sont révélés
35 particulièrement intéressants dans cette nouvelle approche voir G. ZHOU et al., Colloid Polym. Sci., 276 : 1131-1139 (1998).

Les particules conservent des températures critiques inférieures de solubilité (LCST) du même ordre de grandeur que celles des latex non fonctionnalisés, et peuvent être préparées par les procédés classiquement utilisés en polymérisation radicalaire comme les procédés de préparation par
5 précipitation, dispersion, en suspension et en émulsion.

Cependant seul le procédé de polymérisation par la technique de polymérisation en « shot » permet d'obtenir des latex de poly(N-isopropylacrylamide) fonctionnalisés par des fonctions nitrile comportant des
10 particules sur lesquelles les fonctions nitrile sont suffisamment nombreuses en surface.

Comme précisé précédemment cette technique de polymérisation en « shot » n'est utilisable que lorsque la cinétique de polymérisation est connue.

Le procédé de polymérisation en réacteur fermé dite
15 polymérisation en « batch » appliquée à la préparation de latex de poly(N-isopropylacrylamide) fonctionnalisés par des fonctions nitrile ne permet pas d'obtenir des particules sur lesquelles les fonctions nitrile sont suffisamment nombreuses en surface et ne permet pas d'obtenir des rendements suffisants. En effet une partie importante du monomère fonctionnel risque d'être perdue
20 soit à l'intérieur soit sous forme de polymère hydrosoluble. On note également que du fait de l'importante solubilité dans l'eau des monomères de nature polaire, comme les dérivés acrylonitriles et méthacrylonitriles, la copolymérisation conduira à des particules plus petites, avec un taux de conversion limité.

25 Pour que ces latex puissent être utilisés pour l'immobilisation par interaction dipolaire et pour que l'immobilisation soit effective, les groupes fonctionnels polaires respectifs des anticorps et des particules doivent pouvoir être en contact les uns avec les autres facilement.

Les groupes fonctionnels polaires des particules doivent donc être
30 présents à la surface des particules, et en grand nombre, pour que statistiquement les interactions dipolaires puissent avoir lieu et que les immobilisations soient effectives.

Pour atteindre cet objectif, avec des temps de réaction compatibles
35 avec une production industrielle et des rendements suffisants, un procédé de

polymérisation comprenant une étape de prépolymérisation du monomère fonctionnalisé par des groupes polaires a été mis au point.

Cette étape de prépolymérisation permet de synthétiser des homopolymères comportant des fonctions polaires mais étant insolubles dans
5 l'eau.

Elle permet ainsi de créer des chaînes homopolymères radicalaires fonctionnalisées c'est à dire comportant des fonctions polaires, mais qui peuvent ensuite être polymérisées par des techniques comme la polymérisation en « batch ».

10 Cette étape de prépolymérisation, est applicable à tous les monomères fonctionnalisés par des groupes fonctionnels polaires, solubles dans l'eau, dont les homopolymères sont insolubles dans l'eau.

On pourra par exemple prépolymériser des monomères fonctionnalisés hydrosolubles, c'est à dire comportant une fonction polaire,
15 comme les dérivés acrylonitrile et méthacrylonitrile pour obtenir des homopolymères insolubles dans l'eau mais comportant une fonction polaire et susceptible de réagir ensuite sur un polymère non fonctionnalisé.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des particules comportant des fonctions nitrile en nombre suffisant en surface et avec des
20 rendements corrects.

Un objet de l'invention est un procédé de préparation de particules de polymère thermosensible et hydrophile portant des groupes fonctionnels polaires par copolymérisation radicalaire, caractérisé en ce que l'on homopolymérise un monomère hydrosoluble fonctionnalisé par lesdits groupes
25 polaires pour obtenir un homopolymère hydrophobe fonctionnalisé par lesdits groupes polaires puis on copolymérise avec le polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé.

Le procédé de préparation de particules de polymère thermosensible et hydrophile portant des groupes fonctionnels polaires par
30 polymérisation radicalaire selon l'invention peut être défini comme un procédé par lequel on copolymérise un polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé avec un homopolymère hydrophobe fonctionnalisé par lesdits groupes fonctionnels polaires.

35 Le procédé de l'invention comprend en outre les caractéristiques suivantes considérées seules ou en mélange.

Selon l'invention les groupes fonctionnels polaires sont des fonctions nitrile et le monomère hydrosoluble fonctionnalisé est choisi parmi les dérivés acrylonitriles et méthacrylonitriles, par exemple l'acrylonitrile.

Selon un mode de réalisation, le monomère hydrosoluble fonctionnalisé est présent en des quantités comprises entre 15 et 30 % par rapport à la quantité totale des autres monomères.

Selon l'invention le polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé est obtenu par réticulation d'un monomère choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides, et de préférence parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, et, est par exemple le poly(N-isopropylacrylamide).

L'agent de réticulation est hydrosoluble et est choisi parmi le N, N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate.

Le polymère non fonctionnalisé est obtenu par réaction du monomère non fonctionnalisé avec l'agent de réticulation, par exemple le Poly(N-isopropylacrylamide) obtenu par action du MBA sur le NIPAM en présence d'un initiateur.

Le monomère fonctionnalisé est choisi parmi les dérivés acrylonitriles et méthacrylonitriles, le monomère fonctionnalisé étant de préférence de l'acrylonitrile.

Un autre objet de l'invention concerne les particules de polymère thermosensible et hydrophile portant des groupes fonctionnels polaires susceptibles d'être obtenues par un procédé de préparation par copolymérisation radicalaire caractérisé en ce que l'on homopolymérise un monomère hydrosoluble fonctionnalisé par lesdits groupes polaires pour obtenir un homopolymère hydrophobe fonctionnalisé par lesdits groupes polaires puis on copolymérise avec le polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé.

L'invention concerne également un procédé pour isoler dans un échantillon liquide au moins une molécule biologique, selon lequel :

- on dispose de particules selon l'invention,
- on met en contact ledit échantillon avec lesdites particules
- par incubation,

– on sépare les particules de l'échantillon,
et un procédé d'immobilisation sélectif de molécules biologiques
spécifique à partir d'un échantillon selon lequel :

- on dispose de particules selon l'invention,
- 5 – on met en contact ledit échantillon avec lesdites particules et
- on contrôle la sélectivité et la spécificité par contrôle de la
température, la température étant un paramètre critique de l'interaction
molécule biologique particule.

La désorption est favorisée en abaissant la température à une
10 température inférieure à la LCST.

Elle concerne également un réactif pour l'isolement de molécules
biologiques comprenant une dispersion en milieu aqueux de particules selon
l'invention.

L'expression « isoler une molécule biologique » selon l'invention,
15 comprend la séparation, la détection, la purification d'une molécule biologique,
l'enrichissement d'une fraction en une molécule biologique, selon une méthode
d'isolement spécifique ou non spécifique, de manière qualitative et/ou
quantitative, de manière directe ou indirecte par exemple par l'intermédiaire
d'un ligand fixé sur les particules.

20 Par molécule biologique on entend un composé notamment choisi
parmi les protéines, les anticorps, les fragments d'anticorps, les antigènes, les
polypeptides, les enzymes, les haptènes, les acides nucléiques et leurs
fragments, et qui possède au moins un site de reconnaissance lui permettant
de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique.

25 Le terme « acide nucléique » signifie un enchaînement d'au moins
2 désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au
moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant
une base modifiée tel que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la
diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la
30 bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation.
Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison
internucléotidique. L'acide nucléique peut être naturel ou synthétique ; un
oligonucléotide, un polynucléotide un fragment d'acide nucléique, un ARN
ribosomique, un ARN messenger, un ARN de transfert, un acide nucléique
35 obtenu par une technique d'amplification enzymatique telle que la PCR
(Polymerase Chain Reaction), la LCR (Ligase Chain Reaction), la RCR (Repair

Chain Reaction), la 3SR (Self Sustained Sequence Replication), la NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) et la TMA (Transcription Mediated Amplification). Les acides nucléiques générés par une technique d'amplification enzymatique sont désignés sous le terme d'amplicons.

5 Par « polypeptide » on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés. Par acides aminés, on entend les acides aminés primaires qui codent pour les protéines, les acides aminés dérivés après action enzymatique comme la trans-4-hydroxyproline et les acides aminés naturels mais non
10 présents dans les protéines comme la norvaline, la N-méthyl-L leucine, la staline (voir Hunt S. dans Chemistry and Biochemistry of the amino acids, Barrett G.C., ed., Chapman and Hall, London, 1985), les acides aminés protégés par des fonctions chimiques utilisables en synthèse sur support solide ou en phase liquide et les acides aminés non naturels.

Le terme "haptène" désigne des composés non immunogènes,
15 c'est-à-dire incapables par eux mêmes de promouvoir une réaction immunitaire par production d'anticorps, mais capables d'être reconnues par des anticorps obtenus par immunisation d'animaux dans des conditions connues, en particulier par immunisation avec un conjugué haptène-protéine. Ces composés ont généralement une masse moléculaire inférieure à 3000 Da, et le
20 plus souvent inférieure à 2000 Da et peuvent être par exemple des peptides glycosylés, des métabolites, des vitamines, des hormones, des prostaglandines, des toxines ou divers médicaments, les nucléosides et nucléotides.

Le terme "anticorps" inclut les anticorps polyclonaux ou
25 monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétique, et des fragments d'anticorps tels que des fragments Fab ou F(ab')₂.

Le terme " antigène " désigne un composé susceptible de générer des anticorps.

Le terme "protéine" inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines
30 comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métaloprotéines et les glycoprotéines aussi bien fibreuses que globulaires sous leur forme conformationnelle caractéristique.

Exemple 1 : Préparation de latex de Poly(N-isopropylacrylamide) ensemencé

Un mélange de N-isopropylacrylamide (NIPAM) et de N'-méthylène bisacrylamide (MBA) est dissous dans de l'eau désionisée, exempte d'oxygène dans un réacteur de 500 ml équipé d'une agitation mécanique, d'un réfrigérant, d'un thermocouple et sous atmosphère d'azote.

Pour éliminer complètement l'oxygène de la phase monomère, la solution est mise sous agitation à 220 tours/min sous courant d'azote.

La polymérisation est initiée par addition de 20 ml d'une solution aqueuse de persulfate de potassium (KPS) à 70°C, sous une vitesse d'agitation de 303 tours/min, la polymérisation est conduite pendant deux heures.

Le latex de Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est ensuite purifié par des centrifugations et redispersions successives.

Un exemple des quantités de réactifs mis en présence est donné dans le tableau 1.

Tableau 1

REACTIFS	QUANTITES EN GRAMMES
NIPAM – MBA – KPS – EAU	10.80 – 0.80 – 0.40 - 550

Exemple 2 : Préparation de latex de Poly(N-isopropylacrylamide) comportant des groupes fonctionnels nitrile à la surface

Le latex de Poly(N-isopropylacrylamide) ensemencé est désoxygéné par purge par l'azote pendant 30 minutes à 40°C.

De l'eau désionisée et exempte d'oxygène est placée dans un réacteur de 100 ml équipé comme dans l'exemple 1, également désoxygéné par purge à l'azote pendant 20 minutes, puis, une solution aqueuse d'acrylonitrile est ajoutée dans le réacteur dans lequel l'addition d'azote est arrêtée.

Lorsque la température atteint 60°C une solution aqueuse de persulfate de potassium (KPS), l'amorceur, est ajoutée.

La prépolymérisation de l'acrylonitrile (AN) est poursuivie pendant 5 minutes sous agitation à 220 tours/min, puis la dispersion de Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) préparée à l'exemple 1, et exempte d'oxygène, est additionnée dans le réacteur fermé.

5 La réaction de polymérisation est ensuite poursuivie pendant deux heures.

Le latex fonctionnalisé obtenu, est ensuite purifié selon la méthode décrite dans le mode opératoire précédent.

10 Les quantités de réactifs mises en jeu dans cette préparation sont données dans le tableau 2 ci-dessous. Deux lots différents ont été préparés. Ils sont codés ZG-1 et ZG-2.

Tableau 2

CODES DU LATEX	AN (g)	KPS (g)	PNIPAM* (g)	EAU (g)	CONVERSION %
ZG-1	0.20	0.020	20.0	35.0	85.2
ZG-2	0.40	0.020	20.0	35.0	93.8

15 *Teneur en solide du latex de PNIPAM : 6.37 %

Exemple 3 : Influence de la quantité d'acrylonitrile utilisée sur la taille des particules

20 La taille des particules est mesurée en utilisant la mesure du diamètre par diffusion dynamique de la lumière.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 3 ci-dessous.

25 On observe que les tailles des particules du latex portant le code ZG-1 à la fois à 20°C et à 45°C sont plus importantes que les tailles des particules du latex portant le code ZG-0.

Ces données permettent de conclure que les fonctions nitrile ont été introduites de façon prépondérante à la surface des particules de polymères.

Tableau 3**DIAMETRE DES PARTICULES DE PNIPAM PORTANT DES FONCTIONS NITRILE
EN SURFACE**

5

CODE DU LATEX	QUANTITE INITIALE DE AN (g)	DIAMETRE DES PARTICULES (nm)	
		A 20°C	A 45°C
ZG-0*	0	1030	206
ZG-1	0.20	1390	252
ZG-2	0.40	/	259

*Latexensemencé de Poly(N-isopropylacrylamide)

10 **Exemple 4 : Immobilisation d'un anticorps sur la surface de particules fonctionnalisées de Poly(N-isopropylacrylamide) par des fonctions nitrile**

Tous les essais d'adsorption ont été effectués dans des tubes Eppendorf de 2 ml.

15 Pour déterminer la quantité d'anticorps immobilisés (Ac) sur les particules de latex, la méthode classique de déplétion est utilisée.

Un volume donné de particules de latex est additionné dans le tube avec un volume donné de solution d'anticorps puis complété avec une solution tampon (PBS) à 500 ml de volume final.

20 Le mélange est ensuite agité à une température de 32°C pendant trois heures, puis centrifugé à 14 000 rpm à 20°C pendant 20 minutes pour séparer les particules de latex.

Afin de déterminer la concentration résiduelle d'anticorps dans le surnageant, celui-ci est extrait et analysé en utilisant un spectrophotomètre UVIKON.

25 La quantité d'anticorps immobilisés (Ac) est calculée par différence entre la concentration initiale et résiduelle d'anticorps dans le surnageant selon l'équation suivante $N_s = V[(C_i - C_f)/(M \cdot S)]$ dans laquelle V est le volume de la solution en ml, C_i ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) et C_f ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) les concentrations, initiale et finale, d'anticorps dans la solution, M (g) le poids S ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) les surfaces spécifiques
30 des particules de latex.

Les résultats obtenus permettant de quantifier l'impact de la quantité de fonctions nitrile contenues dans les particules de latex PNIPAM fonctionnalisé sur l'immobilisation d'anticorps sont regroupés dans le tableau 4 ci-dessous.

5

Tableau 4

**EFFET DE LA QUANTITE DE FONCTIONS NITRILE CONTENUES DANS LES
PARTICULES DE LATEX FONCTIONNALISEES SUR L'ADSORPTION
D'ANTICORPS AC***

10

CODES DU LATEX	MASSE DE LATEX UTILISEE ($\cdot 10^3$g)	CONCENTRATION RESTANTE D'ANTICORPS DANS LE SURNAGEANT ($\cdot 10^3$mg/ml)	QUANTITE D'ANTICORPS IMMOBILISES SUR LES PARTICULES DE LATEX (mg/m²)^{a)}
ZG-0	4.00	19.20	0
ZG-1	3.96	14.65	0.0371
ZG-2	3.60	10.44	0.1196

*Concentration initiale en anticorps dans la solution : 19.20×10^{-3} mg/ml, volume total 500 ul, temps d'interaction : 3 heures, température : 32°C.

- 15 a) Calculé selon l'équation 1 en utilisant la surface spécifique des deux latex fonctionnalisés ($15.49 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ et $10.18 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ pour ZG2).

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de particules de polymère thermosensible et hydrophile portant des groupes fonctionnels polaires par copolymérisation radicalaire, caractérisé en ce que l'on homopolymérise un monomère hydrosoluble fonctionnalisé par lesdits groupes polaires pour obtenir un homopolymère hydrophobe fonctionnalisé par lesdits groupes puis on copolymérise avec le polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé.
2. Procédé de préparation de particules de polymère thermosensible et hydrophile portant des groupes fonctionnels polaires par polymérisation radicalaire caractérisé en ce que l'on copolymérise un polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé avec un homopolymère hydrophobe fonctionnalisé par lesdits groupes fonctionnels polaires.
3. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que les groupes fonctionnels polaires sont des fonctions nitrile.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le monomère hydrosoluble fonctionnalisé est choisi parmi les dérivés acrylonitriles et méthacrylonitriles.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le monomère hydrosoluble fonctionnalisé est l'acrylonitrile.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que le monomère hydrosoluble fonctionnalisé est présent en des quantités comprises entre 15 et 30 % par rapport à la quantité totale des monomères.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 2 caractérisé en ce que le polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé est obtenu par réticulation d'un monomère choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides, et de préférence parmi le N-isopropylacrylamide, le

N-éthylméthacrylamide, N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide

5

8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le polymère thermosensible et hydrophile non fonctionnalisé est le Poly(N-isopropylacrylamide).

10

9. Particules thermosensibles et hydrophiles portant des groupes fonctionnels polaires caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

15

10. Procédé pour isoler dans un échantillon liquide au moins une molécule biologique, selon lequel :

- on dispose de particules selon la revendication 9,
- on met en contact ledit échantillon avec lesdites particules par incubation,
- on sépare les particules de l'échantillon.

20

11. Réactif pour l'isolement de molécules biologiques comprenant une dispersion en milieu aqueux de particules caractérisé en ce qu'il est constitué par des particules selon la revendication 9.

25

12. Procédé d'immobilisation sélectif de molécules biologiques spécifique à partir d'un échantillon selon lequel :

- on dispose de particules selon la revendication 9,
 - on met en contact ledit échantillon avec lesdites particules et
 - on contrôle la sélectivité et la spécificité par contrôle de la température,
- 30 la température étant un paramètre critique de l'interaction molécule biologique particule.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 PCT/FR 02/01570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 IPC 7 C08F265/08 C08F265/10 B01D67/00 B01D71/42 B01D57/02
 C08F293/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08F B01D C12N C07K B41M A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 919 729 A (MORI YASUTOMO ET AL) 6 July 1999 (1999-07-06) * abrégé ; colonne 3, ligne 51-63 ; revendications 1-13 ; colonne 3, ligne 10-50 ; colonne 4, ligne 30-46 *	1-7, 9, 11
X	US 3 254 138 A (HAGEMEYER JR HUGH J ET AL) 31 May 1966 (1966-05-31)	1-7, 9, 11
Y	* le document entier (particulièrement colonne 1, ligne 66 - colonne 2, ligne 9*	10, 12
X	US 2 620 324 A (COOVER JR HARRY W ET AL) 2 December 1952 (1952-12-02)	1-9, 11
Y	* exemple 1 (colonne 5, ligne 70-75) ; exemples 2-10 ; colonne 2, ligne 23-28 ; colonne 2, ligne 35-55 * column 3, line 20 -column 4, line 14	10, 12
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 2002

Date of mailing of the international search report

22/08/2002

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hammond, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/FR 02/01570

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 764 300 A (KODAK LTD) 28 December 1956 (1956-12-28)	1-9, 11
Y	* revendications 1-9 ; page 2, ligne 57 - page 4, ligne 14 (particulièrement page 3, ligne 82-83 ; page 4, ligne 93-108) *	10, 12
X	--- US 4 062 831 A (KOPECEK JINRICH ET AL) 13 December 1977 (1977-12-13) the whole document	1-12
Y	--- US 5 888 365 A (CHEN SOW-HSIN ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) * colonne 2, ligne 37-54 * column 6, line 14 -column 7, line 3; claims 1-8	10, 12
Y	--- US 4 705 753 A (GREGOR HARRY P ET AL) 10 November 1987 (1987-11-10) * revendications 1,5-9 ; colonne 2, ligne 59 - colonne 3, ligne 10 * abstract	10, 12
Y	--- WO 01 09204 A (CHARMOT DOMINIQUE ;BENOIT DIDIER (US); KLAERNER GERRIT (US); PETRO) 8 February 2001 (2001-02-08) * abrégé ; page 39, ligne 10 - page 42, ligne 16 * page 32, line 5 -page 35, line 6; claims 1-50	10, 12
A	--- FR 2 676 451 A (BIO MERIEUX) 20 November 1992 (1992-11-20) the whole document	1-12
A	--- GB 781 436 A (KODAK LTD) 21 August 1957 (1957-08-21) examples 1-8	1-12
A	--- US 4 301 108 A (ZWICK MAURICE M) 17 November 1981 (1981-11-17) abstract -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/01570

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5919729	A	06-07-1999	JP 9220857 A JP 9263049 A FR 2742380 A1	26-08-1997 07-10-1997 20-06-1997
US 3254138	A	31-05-1966	NONE	
US 2620324	A	02-12-1952	NONE	
GB 764300	A	28-12-1956	US 2790784 A BE 523680 A FR 67529 E FR 1090184 A	30-04-1957 13-03-1958 28-03-1955
US 4062831	A	13-12-1977	CS 173846 B1 AU 8041275 A CA 1041695 A1 CH 619971 A5 DE 2517511 A1 FR 2268818 A1 GB 1467771 A IT 1037561 B JP 50146696 A NL 7504823 A SE 411352 B SE 7504411 A	31-03-1977 28-10-1976 31-10-1978 31-10-1980 13-11-1975 21-11-1975 23-03-1977 20-11-1979 25-11-1975 27-10-1975 17-12-1979 24-10-1975
US 5888365	A	30-03-1999	AU 1183195 A EP 0738338 A1 WO 9514118 A1	06-06-1995 23-10-1996 26-05-1995
US 4705753	A	10-11-1987	NONE	
WO 0109204	A	08-02-2001	AU 5785400 A EP 1208126 A1 WO 0102452 A1 WO 0109204 A2 US 2002001845 A1	22-01-2001 29-05-2002 11-01-2001 08-02-2001 03-01-2002
FR 2676451	A	20-11-1992	FR 2676451 A1	20-11-1992
GB 781436	A	21-08-1957	BE 535394 A FR 67529 E FR 1090184 A	 13-03-1958 28-03-1955
US 4301108	A	17-11-1981	JP 57083512 A	25-05-1982

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D e Internationale No
PCT/FR 02/01570

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C08F265/08 C08F265/10 B01D67/00 B01D71/42 B01D57/02 C08F293/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C08F B01D C12N C07K B41M A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 919 729 A (MORI YASUTOMO ET AL) 6 juillet 1999 (1999-07-06) * abrégé ; colonne 3, ligne 51-63 ; revendications 1-13 ; colonne 3, ligne 10-50 ; colonne 4, ligne 30-46 * ---	1-7,9,11
X	US 3 254 138 A (HAGEMEYER JR HUGH J ET AL) 31 mai 1966 (1966-05-31)	1-7,9,11
Y	* le document entier (particulièrement colonne 1, ligne 66 - colonne 2, ligne 9* ---	10,12
X	US 2 620 324 A (COOVER JR HARRY W ET AL) 2 décembre 1952 (1952-12-02)	1-9,11
Y	* exemple 1 (colonne 5, ligne 70-75) ; exemples 2-10 ; colonne 2, ligne 23-28 ; colonne 2, ligne 35-55 * colonne 3, ligne 20 -colonne 4, ligne 14 ---	10,12
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
° Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">13 août 2002</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22/08/2002</div>	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Hammond, A</div>	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GB 764 300 A (KODAK LTD) 28 décembre 1956 (1956-12-28)	1-9, 11
Y	* revendications 1-9 ; page 2, ligne 57 - page 4, ligne 14 (particulièrement page 3, ligne 82-83 ; page 4, ligne 93-108) *	10, 12
X	--- US 4 062 831 A (KOPECEK JINRICH ET AL) 13 décembre 1977 (1977-12-13) le document en entier	1-12
Y	--- US 5 888 365 A (CHEN SOW-HSIN ET AL) 30 mars 1999 (1999-03-30) * colonne 2, ligne 37-54 * colonne 6, ligne 14 -colonne 7, ligne 3; revendications 1-8	10, 12
Y	--- US 4 705 753 A (GREGOR HARRY P ET AL) 10 novembre 1987 (1987-11-10) * revendications 1,5-9 ; colonne 2, ligne 59 - colonne 3, ligne 10 * abrégé	10, 12
Y	--- WO 01 09204 A (CHARMOT DOMINIQUE ;BENOIT DIDIER (US); KLAERNER GERRIT (US); PETRO) 8 février 2001 (2001-02-08) * abrégé ; page 39, ligne 10 - page 42, ligne 16 * page 32, ligne 5 -page 35, ligne 6; revendications 1-50	10, 12
A	--- FR 2 676 451 A (BIO MERIEUX) 20 novembre 1992 (1992-11-20) le document en entier	1-12
A	--- GB 781 436 A (KODAK LTD) 21 août 1957 (1957-08-21) exemples 1-8	1-12
A	--- US 4 301 108 A (ZWICK MAURICE M) 17 novembre 1981 (1981-11-17) abrégé -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 02/01570

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5919729	A	06-07-1999	JP 9220857 A JP 9263049 A FR 2742380 A1	26-08-1997 07-10-1997 20-06-1997
US 3254138	A	31-05-1966	AUCUN	
US 2620324	A	02-12-1952	AUCUN	
GB 764300	A	28-12-1956	US 2790784 A BE 523680 A FR 67529 E FR 1090184 A	30-04-1957 13-03-1958 28-03-1955
US 4062831	A	13-12-1977	CS 173846 B1 AU 8041275 A CA 1041695 A1 CH 619971 A5 DE 2517511 A1 FR 2268818 A1 GB 1467771 A IT 1037561 B JP 50146696 A NL 7504823 A SE 411352 B SE 7504411 A	31-03-1977 28-10-1976 31-10-1978 31-10-1980 13-11-1975 21-11-1975 23-03-1977 20-11-1979 25-11-1975 27-10-1975 17-12-1979 24-10-1975
US 5888365	A	30-03-1999	AU 1183195 A EP 0738338 A1 WO 9514118 A1	06-06-1995 23-10-1996 26-05-1995
US 4705753	A	10-11-1987	AUCUN	
WO 0109204	A	08-02-2001	AU 5785400 A EP 1208126 A1 WO 0102452 A1 WO 0109204 A2 US 2002001845 A1	22-01-2001 29-05-2002 11-01-2001 08-02-2001 03-01-2002
FR 2676451	A	20-11-1992	FR 2676451 A1	20-11-1992
GB 781436	A	21-08-1957	BE 535394 A FR 67529 E FR 1090184 A	 13-03-1958 28-03-1955
US 4301108	A	17-11-1981	JP 57083512 A	25-05-1982